

(19) 日本国特許庁 (JP) (1) 特許出願公開
 (12) 公開特許公報 (A) 昭58—96052

| | | | |
|---|-------------|---|--|
| (5) Int. Cl. ³ C 07 C 103/52 102/00 // A 61 K 37/24 | 識別記号 107 | 府内整理番号 7375—4H 7375—4H 7138—4C | (4) 公開 昭和58年(1983)6月7日 発明の数 1 審査請求 未請求 |
|---|-------------|---|--|

Toyo, 1020

(全 20 頁)

(6) 高活性 h—PTH (1—34) アミドの製造法

(2) 特 願 昭56—193212
 (2) 出 願 昭56(1981)11月30日
 (2) 発明者 船越獎

京都市左京区一乗寺川原町44

(7) 出願人 東洋醸造株式会社
 静岡県田方郡大仁町三福632の
 1

明細書

1. 発明の名称

高活性 h—PTH (1—34) アミドの製造法

2. 特許請求の範囲

(1) 式

H—Ser—Val—Ser—Glu—Ile—Gln—Leu—Met
 —His—Asn—Leu—Gly—Lys—His—Leu—Asn
 —Ser—Met—Glu—Arg—Val—Glu—Trp—Leu
 —Arg—Lys—Lys—Leu—Gln—Asp—Val—His
 —Asn—Phe—NH₂ (1)

で表わされる h—PTH (1—34) アミドまたはその塩を製造するに当り、C末端フェニルアラニル基のカルボキシル基をアミド基に転化し、式(1)のアミノ酸順序に個々の保護されたアミノ酸および(または)保護されたペプチドを液相合成法により縮合し、縮合反応の最終段階でN末端のアミノ基の保護基および側鎖の官能基の保護基を酸分解により脱離し、得られた h—PTH (1—34) アミドをゲルエ脱離剤および吸着剤を用いるカラムクロマトグラフィーにより分離精製することを特徴

とする高活性 h—PTH (1—34) アミドの製造法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、ヒト副甲状腺ホルモン(h—PTH)(1—34)アミドの製造法に関する。さらに詳しく述べて、本発明は、式

H—¹Ser—²Val—³Ser—⁴Glu—⁵Ile—⁶Gln—⁷Leu—⁸Met—
 —⁹His—¹⁰Asn—¹¹Leu—¹²Gly—¹³Lys—¹⁴His—¹⁵Leu—¹⁶Asn—
 —¹⁷Ser—¹⁸Met—¹⁹Glu—²⁰Arg—²¹Val—²²Glu—²³Trp—²⁴Leu—
 —²⁵Arg—²⁶Lys—²⁷Lys—²⁸Leu—²⁹Gln—³⁰Asp—³¹Val—³²His—
 —³³Asn—³⁴Phe—NH₂ (1)

で表わされるペプチドまたはその塩を製造するに当り、C末端フェニルアラニル基のカルボキシル基をアミド基に転化し、式(1)のアミノ酸順序に個々の保護されたアミノ酸および(または)保護された低級ペプチドを液相合成法により縮合し、縮合反応の最終段階でN末端のアミノ基の保護基および側鎖の官能基の保護基を酸分解により脱離し、得られた h—PTH (1—34) アミドをゲルエ脱離剤および吸着剤を用いるカラムクロマトグラフ

イーにより分離精製することを特徴とする高活性 h-PTH(1-84)アミドの製造法である。

式〔1〕で表わされる h-PTH(1-84)アミドは、元の h-PTH(1-84)より 1.5 ~ 2 倍の h-PTH 活性を有し、しかもこれを抗原として得られる抗体は h-PTH と免疫交叉活性を有する。このため、本ペプチドは副甲状腺機能低下症治療剤および副甲状腺機能検査のための抗体調製用ペプチドとして有用である。

本発明のペプチド〔1〕は、C末端フェニルアラニル基のカルボキシル基をアミド基に転化し、式〔1〕で示されるアミノ酸順序に個々の保護されたアミノ酸および（または）保護された低級ペプチドを液相合成法により縮合し、縮合反応の最終段階で N 末端のアミノ基の保護基および側鎖の官能基の保護基を酸分解により脱離することにより得られる。縮合反応自体はペプチド合成のための常法手段に従つて、保護基の着脱、縮合反応を繰り返すことにより行われる。即ち、本ペプチド〔1〕の原料ならびにすべての中間体の製造にお

いて使用される各種保護基はペプチド合成で既知なもの、従つて酸水分解、酸水解、還元、アミノリシスまたはヒドラジノリシスのような既知手段によつて容易に脱離することができる保護基が用いられる。このような保護基はペプチド合成化学の分野の文献ならびに参考書に記載されている。

例えは、アミノ基に使用する保護基としては、ホルミル基、トリフルオロアセチル基、フタロイル基、p-トルエンスルホニル基、o-ニトロフェニルスルフェニル基などのアシル基、ベンジルオキシカルボニル基、o（または p）-ブロモベンジルオキシカルボニル基、o（または p）-クロロベンジルオキシカルボニル基、p-ニトロベンジルオキシカルボニル基、p-メトキシベンジルオキシカルボニル基などのベンジルオキシカルボニル基、トリクロロエチルオキシカルボニル基、1-ブチルオキシカルボニル基、1-アミルオキシカルボニル基、ジイソプロピルメチルオキシカルボニル基などの脂肪族オキシカルボニル基、2-フェニル-1-イソプロポキシカルボニル基、2-

- 3 -

- 4 -

トリル-1-イソプロポキシカルボニル基、2-p-ジフェニル-1-イソプロポキシカルボニル基などのアラルキルオキシカルボニル基などがある。またこれらアミノ基をベンゾイルアセトン、アセチルアセトンなどの 1,8-ジケトンと反応させることによつて得られるエナミンの形成により保護することができる。

カルボキシル基は、アミド形成、ヒドラチド形成またはエステル化によつて保護される。即ちアミド基は、3,4-ジメトキシベンジル基、ビス（p-メトキシフェニル）メチル基などによつて置換される。ヒドラチド基はベンジルオキシカルボニル基、トリクロロエチルオキシカルボニル基、トリフルオロアセチル基、1-ブチルオキシカルボニル基、トリチル基、2-p-ジフェニル-1-イソプロポキシカルボニル基などによつて置換される。エーテル基はメタノール、エタノール、1-ブタノール、シアノメチルアルコールなどのアルカノール、ベンジルアルコール、p-クロロモーブンジルアルコール、p-クロロベンジルアルコ

ール、2,6-ジクロロベンジルアルコール、p-メトキシベンジルアルコール、p-ニトロベンジルアルコール、ベンズヒドリルアルコール、ベンゾイルメチルアルコール、p-ブロモベンゾイルメチルアルコール、p-クロロベンゾイルメチルアルコールなどのアラルカノール、2,4,6-トリクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、ベンタクロロフェノール、p-ニトロフェノール、2,4-ジニトロフェノールなどのフェノール、チオフェノール、p-ニトロチオフェノールなどのチオフェノールなどによつて置換される。

前記セリンの水酸基は、例えはエステル化またはエーテル化によつて保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えはアセチル基、ベンゾイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エチルオキシカルボニル基などである。またエーテル化に適する基としては、例えはベンジル基、テトラヒドロビラニル基、1-ブチル基である。これらの水酸基の保護には 2,2,2-トリ

- 5 -

-410-

- 6 -

が、必ずしも酸化して保護する必要はない。

本発明においては、 α -アミノ基の保護に1-ブチルオキシカルボニル基、p-メトキシベンジルオキシカルボニル基を用い、N末端の α -アミノ基および側鎖のアミノ基の保護にベンジルオキシカルボニル基を用い、 α -カルボキシル基の保護にメチルエステル基、ベンジルエステル基を用い、側鎖のカルボキシル基の保護にベンジルエステル基を用い、セリンの水酸基を全く保護する場合には、その保護基にベンジル基を用い、アルギニンのグアニジノ基中のアミノ基の保護にメチレン-2-スルホニル基を用いるのが好ましい。

本目的化合物(1)の合成においては、個々のアミノ酸および(または)低級ペプチドの縮合は、例えば保護された α -アミノ基および活性化末端カルボキシル基をもつアミノ酸またはペプチドと遊離の α アミノ基および保護された末端カルボキシル基をもつアミノ酸またはペプチドと反応させるか、あるいは活性化 α -アミノ基および保護された末端カルボキシル基をもつアミノ酸または

- 8 -

せることによつて活性化することができる。

本発明において好ましい縮合方法は、アジド法、活性エステル法およびカルボジイミド法である。縮合の各段階ではラセミ化が起らぬない方法またはラセミ化が最少になる方法を用いるのが望ましく、好ましくはアジド法、活性エステル法、ビュンシユ法。(Z. Naturforsch., 21b, 426 (1966))またはガイガー法(Chem Ber., 108, 788 (1970))などを用いるのが適する。

縮合順序は式(1)で示されるアミノ酸順序であれば、如何なる順序からも合成し得るが、C-末端側から順次アミノ酸および(または)ペプチドを連結させるのが好ましい。

例えば、29～34番のアミノ酸順序からなるC-末端フラグメントと25～28番のアミノ酸からなるペプチドフラグメントを縮合させるのがよい。このC-末端フラグメントとテトラペプチド25～28を縮合させるにはアジド法によつて行うのが適する。得られたC-末端フラグメント25～34の前に22～24番のアミノ酸順序か

フルオロー-1-1-ブチルオキシカルボニルアミノエチル基、2, 2, 2-トリフルオロー-1-ベンジルオキシカルボニルアミノ基も適する。しかししながら、これらの水酸基を必ずしも保護する必要はない。

前記アルギニンのグアニジノ基中のアミノ基を保護するのに使用する基としては、例えばニトロ基、トシリル基、ベンジルオキシカルボニル基、メチレン-2-スルホニル基などであるが、このグアニジノ基を必ずしも保護する必要はない。

前記ヒスチジンのイミノ基を保護するのに使用する基としては、例えばベンジル基、トリチル基、ベンジルオキシカルボニル基、トシリル基、2, 2, 2-トリフルオロー-1-1-ブチルオキシカルボニルアミノエチル基、2, 2, 2-トリフルオロー-1-ベンジルオキシカルボニルアミノエチル基などであるが、このイミノ基を必ずしも保護する必要はない。

前記のメチオニンのチオメチル基はメチルスルホキシド基にして副反応を防止するのが好ましい

- 7 -

ペプチドと遊離の末端カルボキシル基および保護された α -アミノ基をもつアミノ酸またはペプチドを反応させることにより、実施することができる。

この場合、カルボキシル基は、例えば酸アジド、酸無水物、酸イミダゾリドまたは活性エステル、例えばシアノメチルエステル、チオフェニルエステル、p-ニトロチオフェニルエステル、p-ニトロフェニルエステル、2, 4-ジニトロフェニルエステル、2, 4, 5-トリクロロフェニルエステル、2, 4, 6-トリクロロフェニルエ斯特ル、N-ヒドロキシンコハク酸イミドエ斯特ル、N-ヒドロキシフル酸イミドエ斯特ルなどに変換することによつて活性化することができる。またカルボジイミド、例えばN, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド、N-エチル-N'-3-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド、N, N'-カルボニルジイミダゾールまたはイソオキソリウム塩、例えばウツドワード反応剤などの縮合剤を使用して反応さ

らなるペプチドフラグメントを連結させるのであるが、ガイガー法により行うのが適する。得られたC-末端フラグメント22-34の前に順次19~21番のアミノ酸順序からなるペプチドフラグメント、16~18番のアミノ酸順序からなるペプチドフラグメント、18~15番のアミノ酸順序からなるペプチドフラグメント、8~12番のアミノ酸順序からなるペプチドフラグメント、4~7番のアミノ酸順序からなるペプチドフラグメントおよび1~8番のアミノ酸順序からなるペプチドフラグメントを連結させるのが好ましい。これらの縮合はアジド法で行うのが適する。

前記のC-末端フラグメント25-34は、C-末端フラグメント29-34にその残りのアミノ酸順序25-28からなるペプチドフラグメントをアジド法により連結させるのがよい。C-末端フラグメント29-34は、~~ジ~~^ジペプチドフラグメント38-34にジペプチドフラグメント31-32をアジド法により連結させ、その前に残りのアミノ酸順序に各々のアミノ酸を活性エス

テル法により連結させるのがよい。

上記の縮合反応におけるα-アミノ基の保護基、例えば1-ブチルオキシカルボニル基、p-メトキシベンジルオキシカルボニル基はトリフルオロ酢酸で脱離される。α-カルボキシル基の保護基、例えばメチルエステルはこれを希薄な水酸化ナトリウム溶液で分解しまたはヒドラチドあるいはトリクロロエトキシカルボニルヒドラチドのような保護ヒドラチドに変え、またベンジルエステル基は無水希化水素分解、水素添加分解によつて分解し、またはヒドラチドに変えることができる。

こうして保護されたN末端α-アミノ基、ミ-アミノ基、~~カルボキシル基~~側鎖カルボキシル基グアニジノ基および(または)水酸基を有するテトラトリアコンタペプチドが得られる。これらの保護基は、好ましくは酸分解、例えば無水希化水素またはトリフルオロメタンスルホン酸による方法によつて一段階で脱離され、式(1)の目的化合物が得られる。メチオニンのメチルスルホキシド基をチオメチル基に還元する場合には、ジチオ

スレイトール、チオグリコール酸、メルカブトエタノール、エタンジチオールなどによつて行つてもよい。

このようにして得られたペプチド(1)は、ペプチドまたは蛋白質を粗製する公知の手段によつて分離精製することができる。例えば、セフアデツクスG-25、セフアデツクスG-50、セフアデツクスLH-20などのゲル汎過剤を用いるゲル汎過、カルボキシメチルセルロース、イオン交換樹脂などを用いるカラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーなどによつて行うことができる。

本発明のペプチド(1)は、その方法の条件により塩基またはその塩の形で得られる。塩としては、無機酸塩、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、コハク酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸などの有機酸との塩である。

本ペプチド(1)はある種の無機物質または有機物質を付加して錯体を形成し得る。この錯体とは添加した時に生成し、ペプチドに持続作用を与

える化合物を意味する。

尚、本明細書中に記載の略記号は次の意味を有する。

| | |
|-----|----------------|
| Phe | ; L-フェニルアラニン |
| Tyr | ; L-チロシン |
| Asn | ; L-アスパラギン |
| His | ; L-ヒスチジン |
| Met | ; L-メチオニン |
| Val | ; L-バリン |
| Asp | ; L-アスパラギン酸 |
| Gln | ; L-グルタミン |
| Leu | ; L-ロイシン |
| Lys | ; L-リジン |
| Arg | ; L-アルギニン |
| Trp | ; L-トリプトファン |
| Glu | ; L-グルタミン酸 |
| Ile | ; L-イソロイシン |
| Ser | ; L-セリン |
| Gly | ; グリシン |
| Z | ; ベンジルオキシカルボニル |

Boc ; 1-ブトキシカルボニル
 Z (OMe) ; P^{t} -メトキシベンジルオキシカルボニル
 Ms ; N-メチチレン-2-スルホニル
 OBz ; ベンジルエステル
 OMe ; メチルエステル
 OTCP ; 2, 4, 5-トリクロロフェニルエステル
 ONp ; P^{t} -ニトロフェニルエステル
 OSu ; N-ヒドロキシコハク酸イミドエステル
 NHNHTroc ; トリクロロエチルオキシカルボニルヒドラジド
 NHNH₂ ; ヒドラジド
 TFMSA ; トリフルオロメタンスルホン酸
 MSA ; メタンスルホン酸
 TFA ; トリフルオロ酢酸
 TosOH ; P^{t} -トルエンスルホン酸
 HgI ; 塩化水素
 Et₃N ; トリエチルアミン
 CHA ; シクロヘキシルアミン
 DCHA ; ジシクロヘキシルアミン
 EDT ; エタンジオール

- 15 -

DCC ; NN'-ジシクロヘキシルカルボジイミド
 HOBT ; 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール
 EDTA ; エチレンジアミン四酢酸塩
 DMF ; ジメチルホルムアミド
 DMSO ; ジメチルスルホキシド
 HMPA ; ヘキサメチルホスホルアミド
 MeOH ; メタノール
 EtOH ; エタノール
 BuOH ; n -ブタノール
 CHCl₃ ; クロロホルム
 THF ; テトラヒドロフラン
 エーテル ; ジエチルエーテル
 TLC ; 薄層クロマトグラフィー

次に実施例を挙げて本発明の製造例を具体的に説明する。

尚、これら実施例で使用した薄層クロマトグラフィー (TLC) の担体および展開溶媒系、アミノ酸分析の条件並びに PTH 活性測定法は次の通りである。

< TLC >

担体；シリカゲル Q

- 16 -

溶媒系；

1. CHCl₃ - MeOH (10 : 0.5)
2. CHCl₃ - MeOH - 水 (8 : 3 : 1) の下層
3. CHCl₃ - MeOH - 酢酸 (9 : 1 : 0.5)
4. BuOH - ピリジン - 酢酸 - 水 (4 : 1 : 1 : 2)

担体；セルロース (メルク社製, D C - A l u f o l i e n)

溶媒系；

5. BuOH - ピリジン - 酢酸 - 水 (5 : 3 : 0.1 : 11) の上層

< アミノ酸分析 >

特記しない限り、試料は 6 N 塩酸で 110°C、24 ~ 48 時間封管中で加水分解した。

< PTH 活性測定法 >

(1) PTH レセプターの調製

S D 系雄ラット (体重 200 ~ 250 g) を断頭、放血し、開腹の後、腎を摘出し、その表面皮膜を取り除き、腎皮質部分を切り取り、氷冷する。以下の操作はできるだけ低温 (0 ~ 4°C) 下で行う。上記の腎皮質部分を 0.25 M シュクロースお

よび 1 mM EDTA 含有 1.0 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) (以下 A 液と称す) 中に浸し、テフロンベッセルを用いたガラス外套管で腎皮質をその湿重量 (g) の 8 倍容量 (ml) の A 液を加えてホモジナイズする。このホモジネートを 150 X g、10 分間遠心分離し、その上清をさらに 2200 X g、15 分間遠心分離する。上清を捨て、沈殿物の上層の浮濁色の部分を A 液に懸濁し、この懸濁液を 2000 X g、15 分間遠心分離により洗浄し、再び懸濁して容器に分注し、-70°C で凍結して -20°C で保存する。

(2) PTH と PTH レセプターの反応

被検品の h-PTH (1-34) NH₂ を 2 μg/ml と 1.0 μg/ml の濃度になるよう A TP·Mg 2 mM、MgCl₂ 1.0 mM、KCl 6.0 mM、GTP 20 μM、インブチルメチルキサンチン 1 mM、クレアチンホスフェート 8 mM および牛血清アルブミン (BSA) 0.2 % 含有 1.00 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) (以下 B 液と称す) に溶かし、これを標準品牛 PTH (1-84) についても行う。

これら4つの溶液を50μlづつガラス試験管に分注し、各々8本づつ用意する。試料は氷水中に保ち、ATPなど他の物質の分解を抑える。-20℃に保存したPTHレセプター調製品を室温で解凍し、A液に予め溶かしておいたクレアチニナーゼを加え、さらにA液でクレアチニナーゼ0.1mg/ml、PTHレセプター調製品蛋白量1.4mg/mlになるように調製し、氷冷中で保つ。上記の分注された試料溶液を37℃の恒温槽に数分間つけた後に、上記のPTHレセプターークレアチニナーゼ液を50μlづつ加え、37℃で10分間インキュベートする。次いで0.1M酢酸緩衝液(pH4.0)100μlを加え、直ちに氷水中につけた後、すみやかに試験管を沸騰水で1分間加熱し、反応を停止させる。

(3) 生成C-AMPの測定

上記の反応停止試料を蒸留水で10~30倍に希釈し、2000XG、15分間の遠心分離により除蛋白を行う。その上清のC-AMP量をRIAキット(ヤマサ醤油社製)で測定する。

- 19 -

搅拌を続けた。15分後、濃アンモニア水20.9mlを加え、食塩-氷の寒剤下で冷却しながら4時間搅拌した。析出した結晶を沪取した。沪液を減圧濃縮し、得られた結晶を先の結晶と合せて5%アンモニア水で3回、水で3回洗浄した後、ジオキサン-メタノール-酢酸エチルで再結晶化して(1)を得た。収量28.186g(収率85.8%)融点: 180~182℃

TLC; R_f₂ = 0.74(α)_D²⁰ - 17.89°(c=0.92, DMF)元素分析 [C₁₈H₁₈N₂O₄として]

| | C % | H % | N % |
|---|-------|------|------|
| 計算値 | 65.84 | 6.14 | 8.53 |
| 測定値 | 65.76 | 6.28 | 8.44 |
| 2) F(88-84); Z(OMe)-Asn-Phe-NH ₂ (2) | | | |

(1) 5.878gにアニソール3.89ml、TFA A 15.56mlを加え、0℃で1時間搅拌した後、TFAを室温で減圧下留去した。残渣をヘキサンで処理し、生じた沈殿物を傾斜法により分離した。

(4) PTH活性の測定

C-AMPの測定値をPM/mg PTHレセプター蛋白/分の単位に換算し、これを反応の値とし、標準品によつて得られた値に対して被検品を平行線検定2×2点法を用いて検定する。

実施例 1

h-PTH(1-34)NH₂; H-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-AAasn-Ser-Met-Glu-Arg-Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-His-Asn-Phe-NH₂

1) F(84); Z(OMe)-Phe-NH₂ (1) Z(OMe)-Phe-OH 82.984g(0.1M)をTHF 200mlに溶かし、これにEt₃N 15.29ml(0.11M)を加えた後、-20℃に冷却下搅拌しながらイソブチルクロロホルムート14.45ml(0.11M)を滴下した。結晶が析出し、搅拌が困難となつたので、THF 200mlを追加し、

- 20 -

得られたH-Phe-NH₂・TFA/DMF 60ml、Et₃N 2.51mlを加え、次いでZ(OMe)-Asn-ONp 7.471g(17.9mM)、Et₃N 2.51mlを加え、室温で20時間搅拌した。反応液を冷却下少量の酢酸で中和した後、減圧濃縮した。残渣に5%クエン酸水、酢酸エチルを加えて結晶化し、5%クエン酸水、5%重曹水、水の順で結晶を洗浄した後、DMSO-メタノールで再結晶化して(2)を得た。収量6.01g(収率75.9%)融点: 243~245℃

(α)_D²⁵ - 19.3°(c=0.9, DMSO)TLC; R_f₂ = 0.60, R_f₃ = 0.15元素分析 [C₂₂H₂₆N₄O₆として]

| | C % | H % | N % |
|-----|-------|------|-------|
| 計算値 | 59.72 | 5.92 | 12.66 |
| 測定値 | 59.48 | 5.93 | 12.68 |

2) F(81-84); Z(OMe)-Val-His-Asn-Phe-NH₂ (8)

(2) 6.00gにアニソール4.48ml、TFA

17. 72 mlを加え、0℃で60分間攪拌した後、TFAを室温で減圧下留去した。残渣にヘキサンを加え生じた沈殿物を沪取した。これにDMSO-DMF(1:1)5.0ml、Et₃N 1.90mlを加え、H-A_n-Phe-NH₂の溶液を得た。

一方、Z(OMe)-Val-His-NHNH₂ 7.049gをDMF 8.0mlに溶かし、これに-50℃に冷却下3.809N-HCl/DMF溶液15.41ml、次いで亜硝酸イソアミル2.61mlを加えた。-20℃で20分間攪拌後、再度-50℃に冷却下Et₃N 2.51mlを加え、これに上記のH-A_n-Phe-NH₂の溶液を加え、4℃で18時間攪拌した。反応後、溶媒を減圧下留去し、残渣に3%酢酸水、酢酸エチルを加え、生じた沈殿物を沪取した後、3%酢酸水、5%重曹水、水の順で洗浄した。DMSO-MeOHで再結晶化して〔3〕を得た。収量6.216g(収率64.8%)

融点；204～207℃

(α)_D²⁵ -13.9°(C=1.1, DMSO)

- 23 -

融点；286～278℃

(α)_D²⁵ -16.3°(C=1.0, DMSO)

TLC; R_{f2} = 0.39

アミノ酸分析；Asp 2.01(2), Val 1.00(1), Phe 1.00(1), His 0.91(1)

元素分析(C₁₄H₅₃N₉O₁₁として)

| | C % | H % | N % |
|-----|-------|------|-------|
| 計算値 | 59.78 | 6.04 | 14.26 |
| 測定値 | 60.06 | 6.25 | 14.87 |

5) F(29-34); Z(OMe)-Gln-Asp(OBzI)-Val-His-A_n-Phe-NH₂〔5〕〔4〕5.00g(5.66mM)にアニソール3.08ml、TFA 12.32mlを加え、0℃で60分間攪拌した後、TFAを減圧下留去した。残渣にエーテルを加え、析出した沈殿物を沪取、乾燥した。これにDMF 5.0ml、Z(OMe)-Gln-ONp 2.92g、Et₃N 2.53mlを加え、室温で48時間攪拌した。反応液を冷却下数滴の酢酸で中和し、DMFを減圧下留去した。残渣に3%酢酸水、酢酸エチルを加え、析出した粉末を沪取した後、8

TLC; R_{f2} = 0.80

アミノ酸分析；Val 1.02(1), His 0.95(1), Asp 0.98(1), Phe 1.00(1)

元素分析(C₃₃H₄₂N₈O₈・1.4/2H₂Oとして)

| | C % | H % | N % |
|---|-------|------|-------|
| 計算値 | 56.16 | 6.43 | 15.88 |
| 測定値 | 55.90 | 6.14 | 15.70 |
| 4) F(80-84); Z(OMe)-Asp(OBzI)-Val-His-A _n -Phe-NH ₂ 〔4〕〔3〕6.00gにアニソール2.88ml、TFA 11.52mlを加え、0℃で60分間攪拌した後、TFAを室温で減圧下留去した。残渣にエーテルを加え、析出した結晶を沪取、乾燥した後、DMF 5.0ml、Et ₃ N 2.46ml、Z(OMe)-Asp-(OBzI)-ONp 5.3898g、Et ₃ N 1.23mlを加え、室温で18時間攪拌した。反応後、DMFを減圧下留去し、残渣に3%酢酸水、酢酸エチルを加えた。得られた粉末を3%酢酸水、5%重曹水、水の順で洗浄後、DMF-メタノールから8回結晶化して〔4〕を得た。収量6.00g(収率76.8%) | | | |

- 24 -

%酢酸水、5%重曹水、水の順で洗浄した。DMSO-メタノールで2回再沈澱して〔5〕を得た。収量5.111g(収率90.8%)

融点；284～288℃

(α)_D²⁵ -22.6°(C=1.1, DMSO)

TLC; R_{f3} = 0.31

アミノ酸分析；Glu 1.06(1), Asp 2.06(2), Val 1.00(1), Phe 1.00(1), His 0.88(1)

元素分析(C₁₉H₆₁N₁₁O₁₃・H₂Oとして)

| | C % | H % | N % |
|-----|-------|------|-------|
| 計算値 | 57.13 | 6.16 | 14.96 |
| 測定値 | 57.39 | 6.08 | 14.76 |

6) F(27-28); Z(OMe)-Lys(Z)-Leu-OMe〔6〕

H-Leu-OMe 2.91gをDMF 5.0mlに溶かし、0℃に冷却してEt₃N 2.24mlをpH 7に調節後、Z(OMe)-Lys(Z)-OTCP 1.0gをTBP 5.0mlに溶解した溶液とEt₃N 2.24mlを加えて室温で20時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、残渣を酢酸エチルおよび5%クエン酸と共に

- 25 -

-415-

- 26 -

ふりませた。有機層を 5% クエン酸、食塩水、5% 重曹水、食塩水の順で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣にエーテルを加え結晶を得た。MeOH—エーテルから再結晶化して [6] 7.83g (収率 80.1%) を得た。

融点； 107~108°C

$(\alpha)_D^{20} = -21.2^\circ$ (C = 0.9, MeOH)

TLC; Rf₂ = 0.73, Rf₃ = 0.63

元素分析 (C₃₀H₄₁O₃N₈として)

| | C % | H % | N % |
|-----|-------|------|------|
| 計算値 | 68.08 | 7.28 | 7.85 |
| 測定値 | 68.18 | 7.28 | 7.26 |

7) F (26-28) Z (OMe) — Lys (Z) — Lys (Z) — Leu — OMe (7)

[6] 5.72g IC アニソール 2.17mL, TFA 8.68mLを加え、0°Cで1時間攪拌した。TFAを減圧下留去し、残渣を n-ヘキサンで3度洗浄し乾燥した。これを DMF 20mLに溶解し、Et₃N 1.4mLで pH 7 IC 調節後、Z (OMe) — Lys (Z) — OTCP 6.24g, Et₃N 1.4mLを加え室温で20

- 27 -

6.71g を酢酸エチル 20mL および 1N 塩酸 8.64mLと共にふりませた。有機層を水 20mLで洗浄後、減圧濃縮した。この残渣を THF 20mLに溶かし、Et₃N 1.45mLを加え、-10°Cで塩化イソブチロキシカルボニル 1.86mLを加え 5 分間攪拌した。これに上記の粉末を DMF 20mLに溶かし、Et₃N 1.00mLで pH 7 IC 調節した溶液を加え、0°Cで4時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、残渣に 5% クエン酸、エーテルを加え生じた沈殿を沪取した。5% クエン酸、5% 重曹水、水の順で洗浄した。DMF—酢酸エチルから再結晶化して [8] 5.78g (収率 68.5%) を得た。

融点； 151~152°C

$(\alpha)_D^{20} = -8.9^\circ$ (C = 0.7, DMF)

TLC; Rf₂ = 0.76, Rf₃ = 0.75

元素分析 (C₅₈H₈₁O₁₄N₉S として)

| | C % | H % | N % |
|-----|-------|------|-------|
| 計算値 | 60.44 | 6.96 | 10.75 |
| 測定値 | 60.48 | 6.97 | 10.65 |

9) F (25-28); Z (OMe) — Arg (Mts) —

時間攪拌した。反応後、DMFを減圧下留去し、残渣に 5% クエン酸、エーテルを加え生じた沈殿物を沪取した。この沈殿物を 5% クエン酸、水、5% 重曹水、水の順で洗浄した。熱 MeOH—エーテルから再結晶化して [7] 6.71g (収率 80.5%) を得た。

融点； 153~154°C

$(\alpha)_D^{20} = -15.8^\circ$ (C = 1.1, DMF)

TLC; Rf₁ = 0.41

元素分析 (C₄₄H₅₉O₁₁N₅として)

| | C % | H % | N % |
|-----|-------|------|------|
| 計算値 | 68.87 | 7.18 | 8.40 |
| 測定値 | 68.54 | 7.21 | 8.38 |

8) F (25-28) Z (OMe) — Arg (Mts) — Lys (Z) — Lys (Z) — Leu — OMe (8)

[7] 6.00g IC アニソール 2.33mL, TFA

9.33mLを加え、0°Cで1時間攪拌した。TFAを減圧下留去し、残渣にエーテルを加えた後、生じた沈殿を沪取し、乾燥して粉末を得た。

一方、Z (OMe) — Arg (Mts) — OH · CHA

- 28 -

Lys (Z) — Lys (Z) — Leu — NH₂ (9)

[8] 5.78g を MeOH 5.0mL に溶解し、これにヒドラジン水和物 1.28mLを加え、室温で一夜放置した。析出した結晶を沪取し、EtOHで洗浄した。MeOH—EtOH から再結晶化して [9] 5.25g (収率 91.3%) を得た。

融点； 178~180°C

$(\alpha)_D^{20} = -10.1^\circ$ (C = 0.7, DMF)

TLC; Rf₂ = 0.48

アミノ酸分析； Leu 1 (1), Lys 1.94 (2), Arg 1.01 (1)

元素分析 (C₅₈H₈₁O₁₃N₁₁S として)

| | C % | H % | N % |
|-----|-------|------|-------|
| 計算値 | 59.42 | 6.96 | 13.14 |
| 測定値 | 59.29 | 7.17 | 12.87 |

10) F (25-34); Z (OMe) — Arg (Mts)

— Lys (Z) — Lys (Z) — Leu — Gln — Asp (OBzI) — Val — His — Asn — Phe — NH₂ (10)

[5] 5.777g IC アニソール 3.10mL, TFA 12.40mLを加え、0°Cで1時間攪拌した。TFA

- 29 -

-416-

- 30 -

を減圧下留去し、残渣にエーテルを加え、生じた沈殿物を沪取し、乾燥して粉末を得た。これに D M F 3 0 m l 、 E t₃N 1. 5 9 m l を加え、中和溶液を得た。

| | |
|-----------------------------|--------------|
| [9] | 8. 0 8 0 8 g |
| D M F | 2 0 m l |
| 8. 9 3 6 N-H C l / D M F 溶液 | 4. 1 8 m l |
| 亜硝酸イソアミル | 1. 0 9 m l |
| E t ₃ N | 8. 4 4 m l |

上記試薬を用いて前項 8) の方法と同様にして得たアジド溶液に上記の中和溶液を加え、4 °Cで18時間攪拌した。反応液のニンヒドリン反応は陰性であつたが、さらに

| | |
|-----------------------------|------------|
| [9] | 2. 0 0 g |
| D M F | 1 0 m l |
| 8. 9 3 6 N-H C l / D M F 溶液 | 1. 0 4 m l |
| 亜硝酸イソアミル | 0. 2 7 m l |
| E t ₃ N | 0. 8 6 m l |

の試薬を用いて調製したアジド溶液を追加し、18時間攪拌した。反応液を冷却下酢酸数滴で中和し、D M F を減圧下留去した。残渣に8%酢酸水、酢

- 81 -

酸、水の順で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣をM e O H に溶かし、D C H A 5. 4 5 g を加える。M e O H を減圧下留去して、エーテルを加え結晶化した。M e O H - エーテルから再結晶化して〔 1 1 〕を得た。収量 1 0. 1 5 g (収率 9 7. 0 %)。

融点； 1 9 2 ~ 1 9 5 °C

(α)_D²⁰ ; - 2 2. 9 ° (C = 0. 6 , M e O H)

T L C ; R_f₂ = 0. 6 7 , R_f₃ = 0. 6 9

元素分析 (C₂₂H₃₁O₅N₃ + C₁₂H₂₃N として)

| | C % | H % | N % |
|-----|----------|--------|--------|
| 計算値 | 6 8. 1 9 | 9. 0 9 | 9. 3 6 |
| 測定値 | 6 8. 0 7 | 9. 1 4 | 9. 2 7 |

12) F (2 2 - 2 4) B o c - G l u (O B z i) -

T r p - L e u - O H · D C H A (1 2)

〔 1 1 〕 1 0. 0 g を酢酸エチル 5 0 m l 、水 5 0 m l に懸濁し、1N 塩酸 1 7. 1 m l を 0 °C で加えた。析出した塩を沪去した後、有機層を食塩水で洗浄して、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。酢酸エチルを減圧下留去して、油状物を得た。これに 2% E

特開昭58- 96052(9)
酸エチルを加え、生じた沈殿物を沪取し、8%酢酸水、5%重曹水、水の順で洗浄した。D M S O - M e O H で3回再沈殿化して〔 1 0 〕を得た。収量 9. 1 7 1 g (収率 8 0. 8 %)。

融点； 2 2 6 ~ 2 3 0 °C

(α)_D²⁵ ; - 1 7. 8 ° (C = 1. 0 , D M S O)

T L C ; R_f₂ = 0. 4 0

アミノ酸分析； L e u 0. 9 7 (1) , L y s 2. 0 2 (1) , A r g 1. 1 9 (1) , A s p 1. 9 6 (2) , G l u 0. 9 8 (1) , V a l 0. 9 7 (1) , P h e 1. 0 0 (1) , H i s 0. 7 9 (1)

11) F (2 8 - 2 4) B o c - T r p - L e u - O H .

D C H A (1 1)

B o c - T r p - O N p 1 0. 6 5 g を D M F 3 0 m l に溶解した。これに 0 °C で、 H - L e u - O H 8. 9 g を水 1 0 m l 、 D M F 3 0 m l および E t₃N 6. 9 5 m l に溶かして加え、室温で一夜攪拌した。溶媒を減圧下留去し、残渣を5%重曹水、酢酸エチルと共にふりませた。水層をクエン酸で酸性にし、酢酸エチルを加えてふりませた。有機層を5%クエン

- 32 -

D T を含むアニソール 5. 5 7 m l と T F A 2 2. 2 8 m l を加え、0 °C で窒素ガス下、1時間攪拌した。T F A を減圧下留去し、n - ヘキサンで3度洗浄後、乾燥した。これを D M F 5 0 m l に溶かし、B o c - G l u (O B z i) - O S u 7. 4 3 g , E t₃N 4. 7 9 m l を加え、4 °C で 1 6 時間攪拌した。D M F を減圧下留去し、残渣を5%アンモニア水で溶かし、エーテルで洗浄した。水層をクエン酸で酸性とし、生じた油状物を酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣をM e O H に溶かし、D C H A 2. 8 m l を加え、M e O H を減圧濃縮し、エーテルを加えて結晶化した。M e O H - エーテルから3度再結晶化して〔 1 2 〕を得た。収量 7. 8 4 g (収率 5 7. 0 %)。

融点； 1 4 9 ~ 1 5 0 °C

(α)_D²⁰ ; - 2 8. 1 ° (C = 1. 3 , M e O H)

T L C ; R_f₂ = 0. 5 3 , R_f₃ = 0. 7 1

アミノ酸分析； T r p 0. 7 6 (1) , G l u 1. 1 2 (1) , L e u 1 (1) [4 M - M S A , 1 1 0 °C , 4 8 時間]

元素分析 (C₃₄H₄₄O₈N₄・C₁₂H₂₃Nとして)

| | C % | H % | N % |
|-----|-------|------|------|
| 計算値 | 67.58 | 8.26 | 8.56 |
| 測定値 | 67.23 | 8.28 | 8.69 |

特開昭58-96052(10)

13) F (22-34), Boc-Glu(OBz)-Trp
-Leu-Arg(Mts)-Lys(Z)-Lys(Z)-
Leu-Gln-Asp(OBz)-Val-His-Aer
-Phe-NH₂ [13]

[10] 700 gにアニソール3.83 ml、TFA 15.32 mlを加え、溶剤で冷却下60分間攪拌した。TFAを減圧下留去し、残渣にエーテルを加え、生じた沈殿物を沪取した後、5%重曹水、水の順で洗浄し、乾燥して粉末を得た。

一方、[12] 4.319 gにDMP-HMPA-DMSO(1:1:1)の混液3.0 ml、N-メチルホルモリソ.070 ml^{を加え}て攪拌した後、前記の粉末およびHOBT 0.857 g^{を加へ}て溶解させた。これにDCC 1.308 gを加えて、4°Cで18時間攪拌した。反応液はニンヒドリン反応で陽性であったので、さらにDCC 2.18 mgを加え、18時間攪拌した。反応後、冷却下酢酸で中和し、溶媒を減圧下留去した。残渣に3%酢酸水、酢酸エチルを加え、生じた沈殿物を沪取し、3%酢酸水、5%重曹水、水の順で洗浄した。DMP-MeOHで4回再沈殿化して[13]

- 35 -

- 36 -

を得た。収量5.013 g(収率58.2%)

融点：282°C(分解)

[(α)_D²⁵ - 19.4° (C = 0.8, DMSO)]

TLC; R_{f2} = 0.43, R_{f3} = 0

アミノ酸分析；Glu 1.99(2)、Leu 1.92(2)、Asp 1.96(2)、Val 0.95(1)、Phe 1.00(1)、Lys 2.12(2)、His 0.93(1)、Arg 0.98(1)

元素分析 [C₃₂H₄₄N₂₄O₂₇Sとして]

| | C % | H % | N % |
|-----|-------|------|-------|
| 計算値 | 60.47 | 6.77 | 13.76 |
| 測定値 | 60.88 | 6.78 | 13.88 |

14) F (20-21); Z(OMe)-Arg(Mts)-
Val-NHNHTroc [14]

Z(OMe)-Val-NHNHTroc 22.79 gにアニソール10.74 ml、TFA 42.96 mlを加え、0°C 1時間攪拌した。TFAを減圧下留去し、残渣をエーテルで3度洗浄し、乾燥して油状物を得た。

一方、Z(OMe)-Arg(Mts)-OH・CHA 30.0 gを酢酸エチル150 ml、水100 mlに懸濁し、1N塩酸48.41 mlを0°Cで加えた。析出した塩を沪去し

た後、有機層を食塩水で洗浄して、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。酢酸エチルを減圧下留去して油状物を得た。これをTHF 100 mlに溶かし、Et₃N 81.3 mlを加え、-10°Cで塩化イソブチロキシカルボニル 7.53 mlを加え5分間攪拌した。これに上記の油状物をDMP 5.0 mlに溶かし、Et₃N 6.78 mlでPH 7に調節した溶液を加え、-10°Cで2時間、室温で16時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、残渣を酢酸エチルおよび5%クエン酸と共にありませた。有機層を5%クエン酸、食塩水、1%アンモニア水、食塩水の順で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。得られた油状物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー[溶出溶媒 CHCl₃ - MeOH (20:0.5)]により精製した。酢酸エチル-n-ヘキサンより結晶化して[14]を得た。収率29.25 g(収率74.7%)

融点：114～116°C

[(α)_D²⁰ - 24.6° (C = 1.1, MeOH)]

TLC; R_{f2} = 0.62, R_{f3} = 0.46

元素分析 [C₃₂H₄₄O₉N₇SCl₃として]

| | C % | H % | N % |
|-----|-------|------|-------|
| 計算値 | 47.50 | 5.48 | 12.12 |
| 測定値 | 47.24 | 5.43 | 11.88 |

15) F (19 - 21) Boc - Glu (OBz1) - Arg
(Mts) - Val - NHNHTrp [15]

[14] 7.30 g に アニソール 389 ml、TFA 15.57 ml を加え、0℃ 1 時間攪拌する。TFA を減圧下留去し、残渣にエーテルを加えた後、生じた沈殿物を戻取し、乾燥して粉末を得た。これを DMF 50 ml に溶かし、Et₃N 12.6 ml で pH 7 に調節して、Boc - Glu (OBz1) - ONp 413 g と Et₃N 12.6 ml を加え、室温で 16 時間攪拌した。溶媒を減圧下留去し、残渣に 5% クエン酸水、エーテルを加え生じた沈殿物を戻取した。5% クエン酸水、水、5% 重層水、水の順で洗浄し、MeOH - エーテルから再結晶化して [15] を得た。収量 6.29 g (収率 72.5%)。

融点：159 ~ 160 ℃

$[\alpha]_D^{20}$: -31.9° (C = 1.1, MeOH)

TLC ; R_{f2} = 0.68, R_{f3} = 0.74

- 39 -

測定値 55.73 7.18 14.17

17) F (19 - 34) ; Boc - Glu (OBz1) - Arg
(Mts) - Val - Glu (OBz1) - Trp - Leu -
Arg (Mts) - Lys (Z) - Lys (Z) - Leu -
Gln - Asp (OBz1) - Val - His - Asn -
Phe - NH₂ [17]

[13] 480 g (1.96 mM) に アニソール (2% EDT を含む) 326 ml、TFA 12.8 ml を加え、0℃ で 60 分間攪拌した。TFA を減圧下留去し、残渣にヘキサンを加え、生じた沈殿物を戻取、乾燥して粉末を得た。これに DMF 30 ml、Et₃N 0.55 ml を加え、中和溶液を得た。

[16] 2.32 g

| | |
|------------------------|---------|
| DMF | 10 ml |
| 3.936 N - HCl / DMF 溶液 | 1.79 ml |
| 亜硝酸イソアミル | 0.47 ml |
| Et ₃ N | 0.98 ml |
| N - メチルモルホリン | 0.78 ml |

上記試薬を用いて前項 3) の方法と同様にして得たアゾド溶液に上記の中和溶液を加え、4℃ で

元素分析 [C₄₀H₅₇O₁₁N₈SCl₃ として]

| | C % | H % | N % |
|-----|-------|------|-------|
| 計算値 | 49.82 | 5.96 | 11.62 |
| 測定値 | 49.85 | 5.97 | 11.60 |

16) F (19 - 21); Boc - Glu (OBz1) - Arg (Mts)
- Val - NHNH₂ [16]

[15] 6.29 g を 酢酸 1.5 ml に溶解し、亜鉛末 4.25 g を加え、室温で 8 時間攪拌した。酢酸を減圧下留去し、残渣に 5% 重曹水を加え生じた沈殿物を戻取した。飽和 EDTA 水溶液、水の順で洗浄した。MeOH - エーテルから再結晶化して [16] を得た。収量 2.64 g (収率 51.3%)。

融点：186 ~ 187 ℃

$[\alpha]_D^{20}$: -5.6° (C = 0.7, DMF)

TLC ; R_{f2} = 0.58, R_{f3} = 0.55

アミノ酸分析；Glu 1.20 (1)、Leu 1 (1)、
Arg 1.07 (1)

元素分析 [C₃₇H₅₆O₉N₈S · 1/2H₂O として]

| | C % | H % | N % |
|-----|-------|------|-------|
| 計算値 | 55.69 | 7.20 | 14.04 |

- 40 -

4.8 時間攪拌した。反応後、冷却下酢酸で中和し、溶媒を減圧下留去した。残渣に 3% 酢酸水、酢酸エチルを加え、生じた沈殿物を戻取し、3% 酢酸水、5% 重曹水、水の順で洗浄した。DMF - 酢酸エチルで再沈殿化して粗生成物を得た。これを CHCl₃ - MeOH - 水 (8:3:1) 5 ml に溶かしてシリカゲル (23 × 50 cm) にチャージし、溶出溶媒 CHCl₃ - MeOH - 水 (8:3:1) を用いるカラムクロマトグラフィーにより精製した。R_{f2} = 0.41 の溶出区分 (R_{f2} = 0.51 の区分は除く) を集め、減圧濃縮した。残渣に酢酸エチルを加えて粉末化して [17] を得た。収量 4.07 g (収率 67%)。

融点：255 ℃ (分解)

$[\alpha]_D^{25}$: -1.0° (C = 1.0, DMF)

TLC ; R_{f2} = 0.41, R_{f4} = 0.73

アミノ酸分析；Glu 3.06 (3)、Arg (2)、Val 1.87 (2)、Asp 2.07 (2)、Leu 2.03 (2)、Phe 1.00 (1)、Lys 2.16 (2)、His 0.99 (1)

元素分析 [C₁₅₅H₂₀₈N₃₀O₃₄S₂ · 1/2H₂O として]

| | C % | H % | N % |
|-----|---------|-------|---------|
| 計算値 | 5.0.5.4 | 6.8.0 | 1.3.4.4 |
| 測定値 | 5.9.2.4 | 6.6.8 | 1.3.3.7 |

18) F (16 - 18) ; Boc - Asn - Ser - Met - OMe [18]

Chem. Pharm. Bull., 27 (2), 499 ~ 507 (1979)
に記載の方法で得た Z (OMe) - Ser - Met - OMe
18.651 g にアニソール 0.78 ml、TFA 3.912 ml を
加え、0 ℃で 60 分間攪拌した後、TFA を減圧下留去した。残渣をヘキサンで洗浄後、エーテルを加え、生じた沈殿物を傾斜法により分離し、乾燥した。これに DMF 9.0 ml、Et₃N 6.30 ml を加えて攪拌した後、Boc - Asn - ONp 17.49 g、Et₃N 6.93 ml を加えて 16 時間攪拌した。反応後、DMF を減圧下留去し、得られた油状物に 5 % クエン酸含有飽和食塩水、酢酸エチルを加えてふりませた。酢酸エチル層を 5 % クエン酸水、5 % 重曹水、飽和食塩水で洗浄し、無水芒硝で乾燥後、減圧濃縮した。残渣をエーテルで処理して結晶化し、メタノール - エーテルで再結晶化して [18]

- 43 -

元素分析 [C₁₇H₃₂N₆O₇S として]

| | C % | H % | N % |
|-----|---------|-------|---------|
| 計算値 | 4.8.9.5 | 6.9.4 | 1.8.0.9 |
| 測定値 | 4.8.8.6 | 7.0.2 | 1.7.8.7 |

20) F (16 - 34) ; Boc - Asn - Met - Glu (OBz1) - Arg (Mts) - Val - Glu (OBz1) - Trp - Leu - Arg (Mts) - Lys (Z) - Leu - Gln - Asp (OBz1) - Val - His - Asn - Phe - NH₂ [20]

[17] 500 mg (0.161 mM) にアニソール (2 % EDTA 含有) 0.35 ml、TFA 1.40 ml を加え、0 ℃で 60 分間攪拌した後、TFA を減圧下留去した。残渣をヘキサンを加え、生じた沈殿物を沪取し、乾燥して粉末を得た。これに DMF 5 ml、Et₃N 4.52 μl を加えて、中和溶液を得た。

| [19] | 150.5 mg |
|------------------------|----------|
| DMF | 0.20 ml |
| 3.936 N - HCl / DMF 溶液 | 0.20 ml |
| 亜硝酸イソアミル | 51.7 μl |
| Et ₃ N | 108.4 μl |

- 45 -

を得た。収量 12.96 g (収率 62.0 %)

融点 : 133 ~ 135 ℃

[α]_D²⁵ = 31.8° (C = 0.9, DMF)

TLC; R_f 2 = 0.51, R_f 3 = 0.24

元素分析 [C₁₈H₃₂N₄O₈S として]

| | C % | H % | N % |
|-----|---------|-------|---------|
| 計算値 | 4.6.5.4 | 6.9.4 | 1.2.0.6 |
| 測定値 | 4.6.7.7 | 6.8.9 | 1.1.9.8 |

19) F (16 - 18) ; Boc - Asn - Ser - Met - NH₂ [19]

[18] 4.00 g を MeOH 5.0 ml に溶かし、これにヒドラジン水和物 2.15 ml を加え、室温で 18 時間放置した。析出した結晶を EtOH で処理し、沪取した後、EtOH で洗浄した。DMF - EtOH で再結晶して [19] を得た。収量 2.893 g (収率 72.4 %)

融点 : 212 ~ 216 ℃

[α]_D²⁵ = 26.4° (C = 1.0, DMF)

TLC; R_f 2 = 0.32, R_f 3 = 0.10

アミノ酸分析 ; Ser 0.88 (1)、Asp 1.00 (1)、Met 0.40 (1)

- 44 -

上記試薬を用いて前項 3) の方法と同様にして得たアシド溶液に上記の中和溶液を加え、4 ℃で 48 時間攪拌した。反応液を冷却下酢酸で中和し、DMF を減圧下留去し、残渣にエーテル、5 % クエン酸水溶液を加え、生じた沈殿物を沪取した。5 % クエン酸水、5 % 重曹水、水で各々 3 回づつ洗浄し、DMF - 酢酸エチルで 5 回再沈殿化して [20] を得た。収量 4.6.8.8 mg (収率 83.9 %)

融点 : 143 ~ 144 ℃

[α]_D²⁵ = 2.7° (C = 0.8, DMF)

TLC; R_f 2 = 0.57, R_f 4 = 0.79

アミノ酸分析 ; Asp 3.18 (3)、Ser 0.90 (1)、Met 0.70 (1)、Glu 2.98 (3)、Val 1.92 (2)、Leu 2.01 (2)、Phe 1.00 (1)、Lys 2.14 (2)、His 0.96 (1)、Arg 2.12 (2)

元素分析 [C₁₆H₂₂N₃O₃S₃ · 4H₂O として]

| | C % | H % | N % |
|-----|---------|-------|---------|
| 計算値 | 5.7.2.4 | 6.7.9 | 1.8.5.9 |
| 測定値 | 5.7.3.4 | 6.5.9 | 1.8.4.7 |

21) F (14 - 15); Z (OMe) - His - Leu - OMe
[21]

- 46 -

Z (OMe) - His - NH₂ 20.00 g
 4.78 N-HCO₂/DMF 溶液 45.21 ml
 亜硝酸イソアミル 9.58 ml
 DMF 20 ml
 Et₃N 40.32 ml
 Z (OMe) - His - NH₂ 2を前項3) の方法と同様にして得られたアシド溶液に、H - Leu - OMe + HCO₂ 9.08 g を DMF 50 ml に溶かし、Et₃N 7.00 ml を PH 7 に調節した溶液を加えた後、4°Cで20時間攪拌した。DMFを減圧下留去し、残渣を酢酸エチルおよび5%重曹水と共にふりませた。有機層を5%重曹水、食塩水の順で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣にエーテルを加えて結晶化し、MeOH - エーテルから再結晶化して [21] 16.32 g (収率 73.1%)を得た。

融点：110～111°C

[α]_D²⁰ : -24.1° (C = 1.1, MeOH)TLC: R_f 2 = 0.65, R_f 3 = 0.17元素分析 [C₂₂H₃₀O₆N₄として]

- 47 -

TLC: R_f 2 = 0.65元素分析 [C₃₂H₄₈O₈N₆として]

C % H % N %

計算値 59.61 7.50 18.04

測定値 59.61 7.45 18.03

23) F (13-15); Boc - Lys (Z) - His - Leu - NH₂ [23]

[22] 2.65 g を MeOH 20 ml に溶解し、ヒドラン水和物 1.03 ml を加え、室温で2日間放置した。MeOHを減圧下留去し、残渣に水を加えた後、生じた沈殿物を沪取した。MeOH - 酢酸エチルから再結晶化して [23] 2.10 g (収率 79.3%)を得た。

融点：167～169°C

[α]_D²⁰ : -21.4° (C = 1.0, DMF)TLC: R_f 2 = 0.48

アミノ酸分析: Leu 1 (1)、Lys 0.97 (1)、His 0.91 (1)

元素分析 [C₃₁H₄₈O₇N₈として]

C % H % N %

計算値 57.74 7.50 17.38

C % H % N %
 計算値 59.18 6.77 12.55
 測定値 58.93 6.70 12.32

22) F (13-15); Boc - Lys (Z) - His - Leu - OMe [22]

[21] 5.11 g にアニソール 2.49 ml、TFA 9.96 ml を加え、0°Cで1時間攪拌した。TFAを減圧下留去し、残渣にエーテルを加えた後、生じた沈殿物を沪取し、乾燥した。得られた粉末を DMF 20 ml に溶かし、Et₃N 3.19 ml を加え PH 7 に調節後、Boc - Lys (Z) - OSu を加えて、室温で20時間攪拌した。DMFを減圧下留去し、残渣を酢酸エチルおよび5%重曹水と共にふりませた。有機層を5%重曹水、食塩水の順で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。酢酸エチルを減圧下留去し、残渣にエーテルを加えて結晶化し、MeOH - エーテルから再結晶化して [22] 5.42 g (収率 73.7%)を得た。

融点：144～147°C

[α]_D²⁰ : -33.6° (C = 0.7, MeOH)

- 48 -

測定値 57.58 7.52 17.38

24) F (13-34); Boc - Lys (Z) - His - Leu - Asn - Ser - Met - Glu (OBzI) - Arg (Mts) - Val - Glu (OBzI) - Trp - Leu - Arg (Mts) - Lys (Z) - Lys (Z) - Leu - Gin - Asp (OBzI) - Val - His - Asn - Phe - NH₂ [24]

[20] 435 mg (0.127 mM) にアニソール (2% BDT含有) 0.41 ml、TFA 1.64 ml を加え、0°Cで90分間攪拌した後、TFAを減圧下留去した。残渣にヘキサンを加え、生じた油状物を傾斜法により分離した後、エーテルを加えた。生じた沈殿物を沪取し、乾燥して粉末を得た。これに DMF 5 ml、Et₃N 3.5 μl を加え、中和溶液を得た。

[23] 163.8 mg

DMF 3 ml

8.936 N-HCO₂/DMF 溶液 23.2 μl

亜硝酸イソアミル 4.1 μl

Et₃N 8.5 μl

上記試薬を用いて前項3) の方法と同様にして

得たアシド溶液に上記の中和溶液を加え、4°Cで60時間攪拌した。反応液を冷却下酢酸で中和し、DMFを減圧下留去した。残渣に冷却下3%酢酸水、エーテルを加え、生じた沈殿物を沪取した後、3%酢酸水、5%重曹水、水の順で洗浄した。DMF-酢酸エチルで5回再沈殿化して[24]を得た。収量482.3mg(収率96.1%)

融点：118～120°C

$[\alpha]_D^{25} = -2.7^\circ$ (C = 1.1, DMF)

TLC; R_{f2} = 0.38, R_{f4} = 0.75

アミノ酸分析；Lys 8.12(3)、Lys 8.18(3)、His 2.18(2)、Asp 8.10(3)、Ser 0.79(1)、Glu 2.99(3)、Val 1.96(2)、Met 0.48(1)、Phe 1.00(1)、Arg 1.99(2)

元素分析 [C₁₉H₂₆N₄O₄S₃·6H₂Oとして]

| C % | H % | N % |
|-----|-----|-----|
|-----|-----|-----|

計算値 5.720 6.86 13.83

測定値 5.707 6.58 13.67

28) F (11-12); Z(OMe)-Leu-Gly-
OMe [25]

- 51 -

5.3.0.4 mlを加え、0°C 1時間攪拌した。TFAを減圧下留去し、残渣をn-ヘキサンで3度洗浄後、乾燥した。これをDMF 100mlに溶解し、Et₃N 8.54mlでPH7に調節した後、Z(OMe)-Asn-ONp 25.46g、Et₃N 8.54mlを加え、室温で20時間攪拌した。DMFを減圧下留去し、残渣に5%クエン酸、酢酸エチルを加えた後、生じた沈殿を沪取した。5%クエン酸、5%重曹水、水の順で洗浄し、DMF-酢酸エチルから再結晶化して[26] 224.2g(収率76.5%)を得た。

融点：196～197°C

$[\alpha]_D^{22} = -15.4^\circ$ (C = 0.8, DMF)

TLC; R_{f2} = 0.56, R_{f3} = 0.33

元素分析 [C₂₂H₃₂O₈N₄として]

| C % | H % | N % |
|-----|-----|-----|
|-----|-----|-----|

計算値 5.499 6.71 11.66

測定値 5.514 6.86 11.60

27) F (9-12); Z(OMe)-His-Asn-
-Leu-Gly-OMe [27]

[26] 14.03gにアニソール0.52ml、TFA

H-Gly-OMe-HCl 12.56gをDMF 50mlに溶解し、Et₃N 14mlでPH7に調節した後、Z(OMe)-Leu-ONp 41.64g、Et₃N 14mlを加えて、室温で18時間攪拌した。DMFを減圧下留去し、残渣を酢酸エチルに溶解した。5%クエン酸、5%重曹水、食塩水の順で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣にエーテルを加えて結晶化した後、酢酸エチル-エーテルから再結晶化して[25] 28.98g(収率79.1%)を得た。

融点：78～79°C

$[\alpha]_D^{25} = 13.1^\circ$ (C = 0.7, DMF)

TLC; R_{f2} = 0.71

元素分析 [C₁₈H₂₆O₆N₂として]

| C % | H % | N % |
|-----|-----|-----|
|-----|-----|-----|

計算値 5.900 7.15 7.65

測定値 5.917 7.16 7.59

26) F (10-12); Z(OMe)-Asn-Leu-Gly-
-OMe [26]

[25] 22.36gにアニソール13.26ml、TFA

- 52 -

3.8.0.8 mlを加え、0°C 1時間攪拌した。TFAを減圧下留去し、残渣にエーテルを加えた後、生じた沈殿を沪取し、乾燥して粉末を得た。

| | |
|------------------------------|---------|
| Z(OMe)-His-NHNH ₂ | 11.67g |
| 5.55N-HCl/DMF溶液 | 22.70ml |
| 亜硝酸イソアミル | 5.59ml |
| DMF | 20ml |
| Et ₃ N | 22.54ml |

上記試薬を用いて前項3)の方法と同様にして得られたアシド溶液に、上記で得た粉末をDMF 70mlに溶解し、Et₃N 4.09mlでPH7に調節した溶液を加えた。4°Cで20時間攪拌した。DMFを減圧下留去し、残渣に5%重曹水、エーテルを加えた後、生じた沈殿を沪取^{した}。5%重曹水、水の順で洗浄し、DMF-MeOHから再結晶化して[27] 15.13g(収率88.9%)を得た。

融点：226～227°C

$[\alpha]_D^{22} = -11.1^\circ$ (C = 0.8, DMF)

TLC; R_{f2} = 0.37

元素分析 [C₂₈H₃₂O₉N₄として]

| | C % | H % | N % |
|-----|-------|------|-------|
| 計算値 | 54.45 | 6.36 | 15.88 |
| 測定値 | 54.31 | 6.38 | 15.73 |

28) F (8-12); Boc-Met-His-Aen-Leu-Gly-OMe [28]

[27] 5.08 g にアニソール 4.0 ml、TFA 12.0 ml を加え、0℃ 1 時間攪拌した。TFA を減圧下留去し、エーテルを加えた後、生じた沈殿物を沪取し、乾燥して粉末を得た。これに DMP 5.0 ml、Et₃N 2.28 ml を加えて攪拌した後、Boc-Met-O-Su 2.85 g、Et₃N 1.14 ml を加え、24 時間攪拌した。反応液を冷却下酢酸で中和し、DMP を減圧下留去した。残渣をブタノールに溶かし、水で4回洗浄した後、減圧濃縮した。残渣にエーテルを加え、生じたゲル状粉末を沪取し、MeOH-EtOH で2回再結晶化して [28] を得た。収量 2.57 g (収率 45.7%)。

融点：122～125℃

$[\alpha]_D^{25} = 26.7^\circ$ (C = 0.7, DMP)

TLC; R_f 2 = 0.59

- 55 -

Glu(OBz1)-Trp-Leu-Arg(Mts)-Lys(Z)-Lys(Z)-Leu-Gln-Aep(OBz1)-Val-His-Aen-Pho-NH₂ [30]

[24] 4.823 mg (0.122 mM) にアニソール (2% EDTA 含有) 0.46 ml、TFA 1.84 ml を加え、0℃ で90分間攪拌した後、TFA を減圧下留去した。残渣をヘキサンで洗浄した後、エーテルを加え、生じた沈殿物を沪取、乾燥した。得られた粉末に DMP 5 ml、Et₃N 51.0 μl を加え、中和溶液を得た。

(29) 16.71 mg

| | |
|--------------------|----------|
| DMP | 3 ml |
| 3.936 N-HO&/DMP 溶液 | 22.83 μl |
| 亜硝酸イソアミル | 3.90 μl |
| Et ₃ N | 16.33 μl |

上記試薬を用いて前項3)の方法と同様にして得たアジド溶液に上記の中和溶液を加え、4℃で48時間攪拌した。反応液を冷却下酢酸で中和し、DMP を減圧下留去した。残渣に 5% クエン酸水、エーテルを加え、生じた沈殿物を沪取し、5% ク

29) F (8-12); Boc-Met-His-Aen-Leu-Gly-NHNH₂ [29]

[28] 8.27 g を DMP-MeOH (4:1) 3.0 ml に溶かし、これにヒドラジン水和物 1.20 ml を加え、室温で18時間放置した。溶媒を減圧下留去し、残渣に EtOH で処理して結晶化させ、沪取した後、MeOH-EtOH で2回再結晶化して [29] を得た。収量 2.98 g (収率 90.9%)。

融点：184～186℃

$[\alpha]_D^{25} = 33.1^\circ$ (C = 0.9, DMP)

TLC; R_f 2 = 0.31

アミノ酸分析； Aep 0.95 (1)、 Gly 1.01 (1)、 Met 0.92 (1)、 Leu 1.00 (1)、 His 0.95 (2)

元素分析 [C₂₈H₄₈N₁₀O₈S として]

| | C % | H % | N % |
|-----|-------|------|-------|
| 計算値 | 49.11 | 7.07 | 20.46 |
| 測定値 | 49.04 | 7.14 | 20.23 |

30) F (8-34); Boc-Met-His-Aen-Leu-Gly-Lys(Z)-His-Leu-Aen-Ser-Met-Gln(OBz1)-Arg(Mts)-Val-

- 56 -

エン酸水、5%重曹水、水の順で洗浄した。DMP-酢酸エチルで5回再沈殿化して粗製の [30] を得た。これを DMP 1.0 ml に溶かし、セフアデックス LH-60 ($\frac{3.3 \times 140 \text{ cm}}{\text{カラム}}$) にチャージし、DMP で溶出した。各フラクションは 9 ml づつ分画し、43～55番目のフラクションを集めて減圧乾固した。残渣を酢酸エチルで処理して粉末化して [30] を得た。収量 3.609 mg (収率 6.7%)。

融点：135～137℃

$[\alpha]_D^{25} = 4.7^\circ$ (C = 0.6, DMP)

TLC; R_f 2 = 0.34, R_f 4 = 0.69

アミノ酸分析； Aep 4.27 (4)、 Gly 1.23 (1)、 Met 1.61 (2)、 Leu 4.36 (4)、 His 3.06 (3)、 Ser 0.81 (1)、 Glu 8.03 (3)、 Val 2.00 (2)、 Phe 1.00 (1)、 Lys 3.15 (3)、 Arg 2.00 (2)

元素分析 [C₂₁H₃₀N₄O₅S₄·5H₂O として]

| | C % | H % | N % |
|-----|-------|------|-------|
| 計算値 | 56.55 | 6.81 | 14.66 |
| 測定値 | 56.32 | 6.66 | 14.77 |

31) F (6-7); Z(OMe)-Gln-Leu-NHNH

Troc [31]

Z (OMe) — Leu — NHNH Troc 20.00 g に アニソール 8.96 ml、TFA 35.84 ml を加え、0°C 1 時間攪拌した。TFA を減圧下留去し、残渣を n-ヘキサンで洗浄し、乾燥した。これを DMF 120 ml に溶解し、Et₃N 11.52 ml、Z (OMe) — Gln — ONp を加え、室温で 18 時間攪拌した。DMF を減圧下留去し、残渣に 5% クエン酸水、酢酸エチルを加えた後、生じた沈殿物を沪取した。5% クエン酸水、5% 重曹水、水の順で洗浄し、DMF — 酢酸エチルから再結晶化して [31] 20.70 g (収率 20%)を得る。

融点：188～190°C

[α]_D²⁰ : -17.1° (C = 1.0, DMF)TLC; R_f 2 = 0.65, R_f 3 = 0.44元素分析 [C₂₃H₃₂O₈N₅C₆H₅として]

C % H % N %

計算値 45.07 5.26 11.43

測定値 45.52 5.41 11.52

32) F (5-7); Z (OMe) — Ile — Gln — Leu — NHNH

- 59 -

[32] 15.0 g に アニソール 8.99 ml、TFA 35.69 ml を加え、0°C 1 時間攪拌した。TFA を減圧下留去し、残渣にエーテルを加えた後、生じた沈殿物を沪取し、乾燥した。これを DMF 50 ml に溶解し、Et₃N 5.80 ml、Boc — Gln (OBz1) — OSu 8.99 g を加え、室温で 20 時間攪拌した。DMF を減圧下留去し、残渣に 5% クエン酸水、エーテルを加えた後、生じた沈殿物を沪取した。5% クエン酸水、5% 重曹水、水の順で洗浄した。DMF — MeOH から再結晶化して 15.89 g (収率 87.1%)を得た。

融点：223～225°C

[α]_D¹⁸ : -26.3° (C = 0.6, DMSO)TLC; R_f 2 = 0.59, R_f 3 = 0.49元素分析 [C₃₇H₅₆O₁₁N₇C₆H₅として]

C % H % N %

計算値 50.43 6.41 11.13

測定値 50.33 6.52 11.63

34) F (4-7); Boc — Gln (OBz1) — Ile — Gln — Leu — NHNH₂ [34]

Troc [32]

[31] 20.70 g に アニソール 11.00 ml、TFA 44.0 ml を加え、0°C 1 時間攪拌した。TFA を減圧下留去し、残渣を n-ヘキサンで 3 度洗浄した後、乾燥した。これを DMF 200 ml に溶解し、Et₃N 94.8 ml、Z (OMe) — Ile — ONp 14.09 g を加え、室温で 18 時間攪拌した。DMF を減圧下留去し、残渣に 5% クエン酸水、酢酸エチルを加えた後、生じた沈殿物を沪取した。5% クエン酸水、5% 重曹水、水の順で洗浄し、DMF — 酢酸エチルから再結晶化して 17.43 g (収率 79.1%) を得た。

融点：205～207°C

[α]_D²⁰ : -15.3° (C = 0.9, DMF)TLC; R_f 2 = 0.62, R_f 3 = 0.32元素分析 [C₂₉H₄₃O₉N₆C₆H₅として]

C % H % N %

計算値 47.97 5.97 11.58

測定値 48.16 6.17 11.66

33) F (4-7); Boc — Gln (OBz1) — Ile — Gln — Leu — NHNH Troc [33]

- 60 -

[33] 9.0 g を DMF 40 ml に溶かし、酢酸 6.81 ml、亜鉛末 6.67 g を加え、室温で 18 時間攪拌した。亜鉛末を沪去後、沪液を減圧濃縮し、残渣に飽和 EDTA 溶液を加えた後、重曹を加えて pH 7 に調節すると沈殿物が生じた。この沈殿物を飽和 EDTA 溶液、水の順で洗浄し、DMF — MeOH から 2 度再結晶化して [34] 5.31 g (収率 73.7%)を得た。

融点：260°C 以上で分解

[α]_D¹⁸ : -22.3° (C = 0.6, DMSO)TLC; R_f 2 = 0.84

アミノ酸分析； Gln 2.06 (2), Ile 1.01 (1)

Leu 1 (1)

元素分析 [C₃₄H₅₅O₉N₇C₆H₅として]

C % H % N %

計算値 57.85 7.85 13.89

測定値 57.76 8.00 13.64

35) F (4-34) ; Boc — Gln (OBz1) — Ile — Gln — Leu — Met — His — Asn — Leu — Gly — Lys (Z) — His — Leu — Asn — Ser — Met

- 61 -

—424—

- 62 -

— Glu (OBzI) — Arg (Mta) — Val — Glu
 (OBzI) — Trp — Leu — Arg (Mta) — Lys(Z)
 — Lys (Z) — Leu — Gin — Asp (OBzI) —
 Val — His — Asn — Phe — NH₂ [35]

[30] 357.1 mg (0.0794 mM) に アニソール 0.35 ml、TFA 1.4 ml を加え、0°C で 90 分間攪拌した後、TFA を減圧下留去した。残渣にヘキサンを加え、生じた油状物を傾斜法により分離した後、エーテルを加え、生じた沈殿物を沪取し、乾燥して粉末を得た。これに DMP 5 ml、Et₃N 44.3 μl を加えて中和溶液を得た。

| | |
|----------------------|----------|
| [34] | 112.1 mg |
| DMP | 1 ml |
| 3.936 N-HCl / DMP 溶液 | 9.68 μl |
| 亜硝酸イソアミル | 2.53 μl |
| Et ₃ N | 7.97 μl |

上記試薬を用いて前項 3) の方法と同様にして得たアジド溶液に上記の中和溶液を加え、4°C で 48 時間攪拌した。反応液を冷却下酢酸で中和し、DMP を減圧下留去した。残渣に 5% クエン酸水、

- 63 -

測定値 56.47 6.91 14.29

36) F(2-3); Z(OMe) — Val — Ser — OMe [36]
H — Ser — OMe 15.56 g を DMP 80 ml に溶かし、Et₃N 14.0 ml で pH 7 に調節した。この溶液に Z(OMe) — Val — OH 28.13 g を THF 140 ml に溶かした溶液を加えた後、-10°C で DCC 24.76 g を加え 3 時間、室温で 15 時間攪拌した。沈殿物を沪去後、溶媒を減圧留去し、析出した結晶を EtOH で沪取した。THF-EtOH から再結晶化して [36] 22.19 g (収率 58.0%) を得た。

融点：160 ~ 161 °C

$[\alpha]_D^{20}$: 9.9° (C = 0.9, DMP)

TLC : Rf 2 = 0.63, Rf 3 = 0.64

元素分析 (C₁₈H₂₆O₇N₂ として)

| | C % | H % | N % |
|-----|-------|------|------|
| 計算値 | 56.53 | 6.85 | 7.33 |
| 測定値 | 56.70 | 6.96 | 7.36 |

37) F(1-3); Z — Ser — Val — Ser — OMe [37]

(36) 7.15 g に アニソール 4.06 ml、TFA 16.24 ml を加え、0°C 1 時間攪拌した。TFA を

特開昭58-96052(17)
エーテルを加え、生じた沈殿物を沪取し、5% クエン酸水、5% 重曹水、水の順で洗浄した。DMP-酢酸エチルで 2 回再沈殿化して粗製の [35] を得た。これを DMP 5 ml に溶かし、セファデック S.I.B-60 のカラム (3.3 × 140 cm) にチャージし、DMP で溶出した。各フラクションは 9 ml づつ分画し、54 ~ 61 番目のフラクションを集めて減圧乾燥した。残渣を酢酸エチルで処理して粉末化して [35] を得た。收量 240.3 mg (収率 59.7%)

融点：138 ~ 141 °C

$[\alpha]_D^{25}$: 4.0° (C = 0.5, DMP)

TLC : Rf 2 = 0.43, Rf 4 = 0.77

アミノ酸分析；Glu 4.93 (5)、Ile 1.07 (1)、Leu 5.41 (5)、Asp 4.24 (4)、Ser 0.83 (1)、Gly 1.22 (1)、Val 2.04 (2)、Met 1.75 (2)、Phe 1.00 (1)、Lys 3.00 (3)、His 2.92 (3)、Arg 1.94 (2)

元素分析 (C₂₄H₃₄N₅S₄O₅ · 7H₂O として)

| | C % | H % | N % |
|-----|-------|------|-------|
| 計算値 | 56.62 | 8.92 | 14.28 |

- 64 -

減圧留去し、残渣を n-ヘキサンで 3 度洗浄した後、乾燥して油状物を得た。これを DMP 35 ml に溶かし、Et₃N 2.62 ml を加えて中和溶液を得た。

Z — Ser — NH₂ 5.68 g

5.55 N-HCl/DMP 溶液 9.70 ml

亜硝酸イソアミル 3.58 ml

DMP 10 ml

Et₃N 11.31 ml

上記試薬を用いて前項 3) の方法と同様にして得たアジド溶液に上記の中和溶液を加え、4°C で 48 時間攪拌した。沈殿物を沪去し、沪液を減圧濃縮した後、残渣に EtOH を加えた。生じた沈殿物を沪取し、DMP-MeOH から再結晶化して [37] 4.94 g (収率 60.1%) を得た。

融点：211 ~ 213 °C

$[\alpha]_D^{20}$: 6.4° (C = 0.9, DMP)

TLC : Rf 2 = 0.66

元素分析 (C₂₀H₂₉O₈N₃ として)

| | C % | H % | N % |
|-----|-------|------|------|
| 計算値 | 54.66 | 6.65 | 9.56 |

- 65 -

-425-

- 66 -

測定値 54.75 6.52 9.45
 38) P(1-3); Z-Ser-Val-Ser-NHNH₂
 [38] (37) 8.27 g を DMF 20 ml、MeOH 10 ml に溶解し、ヒドラジン水和物 1.86 ml を加え一夜放置した。析出した結晶を MeOH で汎取し、EtOH で洗浄後、DMSO-MeOH から再結晶化して [38] 2.65 g (收率 81.3%)を得た。
 融点: 240 °C
 $[\alpha]_D^{22} = -3.4^\circ$ (C = 0.6, DMSO)
 TLC; R_f 2 = 0.44
 アミノ酸分析: Ser 1.83 (2)、Val 1 (1)
 元素分析 [C₁₉H₂₉O₂N₅として]
 C % H % N %
 計算値 51.92 6.65 15.94
 測定値 51.63 6.65 15.98

39) P(1-34); Z-Ser-Val-Ser-Glu(OBzI)-Ile-Gln-Leu-Met-His-Aen-Leu-Gly-Lys(Z)-His-Leu-Aen-Ser-Met-Glu(OBzI)-Arg(Mts)-Val-Glu(OBzI)-Trp-Leu-Arg

- 67 -

酢酸エチルで 5 回再沈殿化して粗製の [39] 199.8 mg を得た。これを DMF 10 ml に溶かし、セファクリル S-200 のカラム (3.4 × 140 cm) にチャージし、DMF-水 (95:5) の混液で溶出した。各フラクションを 10 ml づつ分画した。各フラクションは 280 nm で追跡し、75~89 番目のフラクションを集め、減圧乾固した。残渣を酢酸エチルで処理して粉末 141.3 mg を得た。これを DMF 5 ml に溶かし、上記と同一条件でカラムクロマトグラフィーを行った。76~88 番目のフラクションを集め、減圧乾固した。残渣を酢酸エチルで処理して精製した [39] を得た。收量 111.3 mg

融点: 145~148 °C
 $[\alpha]_D^{25} = -3.5^\circ$ (C = 0.3, DMF)
 TLC; R_f 2 = 0.60, R_f 4 = 0.81
 アミノ酸分析: Ser 2.78 (3)、Val 3.18 (3)、Acp 4.21 (4)、Glu 6.10 (5)、Gly 1.08 (1)、Met 1.49 (2)、Ile 1.07 (1)、Leu 5.18 (5)、Phe 1.00 (1)、Lys 2.91 (3)、His 2.45 (3)、Arg 1.91 (2)

特開昭58-96052(18)
 (Mts)-Lys(Z)-Lys(Z)-Leu-Gin-Acp(OBzI)-Val-His-Acp-Phe-NH₂
 [39]

[38] 240.3 mg (0.0474 mM) にアニソール (2% EDT 含有)、TFA 0.84 ml を加え、0 °C で 90 分間攪拌した後、TFA を減圧下留去した。残渣をヘキサンで洗浄し、エーテルを加え、生じた沈殿物を汎取、乾燥して粉末を得た。これに DMF 5 ml、Et₃N 26.4 μl を加えて中和溶液を得た。

[38] 41.7 mg

DMF 1 ml

3.936 N-HCl/DMF 溶液 57.8 μl

亜硝酸イソアミル 15.1 μl

Et₃N 47.6 μl

上記試薬を用いて前項 3) の方法と同様にして得たアジド溶液に上記の中和溶液を加え、4 °C で 48 時間攪拌した。反応液を冷却下酢酸で中和し、DMF を減圧下留去した。残渣に 3% 酢酸水、エーテルを加え、生じた沈殿物を汎取し、3% 酢酸水、5% 重曹水、水の順で洗浄した。DMF-酢

- 68 -

アミノ酸分析 [4 M-MSA, 110 °C, 48 時間]; Glu 5.13 (5)、Ile 1.02 (1)、Leu 5.36 (5)、Acp 4.40 (4)、Ser 0.94 (3)、Gly 1.22 (1)、Val 1.90 (3)、Met 1.78 (2)、Phe 1.00 (1)、Trp 0.59 (1)、Lys 2.96 (3)、His 2.92 (3)、Arg 1.91 (2)

元素分析 [C₂₅₉H₃₆₀N₅₆O₆₂S₄·7H₂O として]

| C % | H % | N % |
|-----------|------|-------|
| 計算値 56.51 | 6.85 | 14.24 |
| 測定値 56.55 | 6.81 | 13.98 |

40) h-PTH(1-34)NH₂

[39] 200 mg (0.0372 mM) に m-クレゾール 0.78 ml を加え、次いで 1 M-TFM S A と 1 M チオアニソール含有 TFA 溶液 7.44 ml を加え、0 °C で 2 時間攪拌した後、ヘキサンを加え、生じた油状物を傾斜法により分離した。エーテルを加えて粉末化し、すばやく汎取、乾燥した。得られた粉末を冷却下水 10 ml に溶かし、これにアンバーライト CG-4B 樹脂 (アセテート型) 約 2 g を加え、30 分間攪拌した。樹脂を汎去後、汎液を氷冷下 5 N アンモニア水で pH を 10.0 に調節した。再び酢酸

酸性とした後、凍結乾燥して粗生物を得た。TLC ; R_f ₅ = 0.48 (ニンヒドリン反応)、 R_f ₅ = 0.5 (エールリツヒ反応)。これを1N酢酸水5mlに溶かし、セファデックスG-50のカラム(2.8×143cm)にチャージし、1N酢酸水でゲル沪過した。溶出液は10mlづつ分画し、280nmで追跡した。36～57番目のフラクションF-Iと58～72番目のフラクションF-IIを凍結乾燥して粉末F-I 31.8mg(収率18.3%)および粉末F-II 140.1mg(収率80.8%)を得た。

F-II 140mgを8M尿素含有0.01M酢酸アンモニウム水溶液(PH 5.1)5mlに溶かし、これと0.01M酢酸アンモニウム水溶液(PH 5.1)で平衡化したGM-セルロースのカラム(2.4×5cm)にチャージした。0.01M酢酸アンモニウム水溶液(PH 5.1)40mlで洗浄し、0.01M酢酸アンモニウム水溶液(PH 5.1)300mlと0.3M酢酸アンモニウム水溶液(PH 5.1)300mlの間で直線濃度勾配をかけて溶出した。溶出液を5mlづつ分画し、各フラクションを280nmで追跡し

- 71 -

溶出液は10mlづつ分画し、各フラクションを280nmで追跡し、27～38番目のフラクションを集めて凍結乾燥して白色粉末38.6mg(収率22.3%)を得た。この粉末をブタノール-ビリジン-酢酸-0.6M酢酸アンモニウム水溶液(5:0.1:11)の上層液2mlに溶かし、セファデックスG-50のカラム(2.4×94cm)にチャージし、上記上層液で溶出した。溶出液は5.3mlづつ分画し、各フラクションをFolin-Lowry法で発色後、750nmの吸光度の測定により追跡した。35～40番目のフラクションF-II-31、41～49番目のフラクションF-II-32(TLC; R_f ₅ = 0.48)および50～75番目のフラクションF-II-33を得た。F-II-32のフラクションを集め、減圧濃縮した後、凍結乾燥を4回行つてH-PTH(1-34)NH₂を得た。収量22.8mg

TLC, R_f ₅ = 0.48

$[\alpha]_D^{24} = 55.2^\circ$ (C = 0.2、0.1N酢酸水)

アミノ酸分析; Asp 4.00 (4)、Ser 2.34 (3)、Glu 4.80 (5)、Gly 1.11 (1)、Val 3.18 (3)、

特開昭58- 96052(19)
て35～60番目のフラクションF-II-1、61～85番目のフラクションF-II-2、86～115番目のフラクションF-II-3および116～150番目のフラクションF-II-4を得た。各フラクションを集めて凍結乾燥し、水酸化アンモニウムを除くため、水を加え3回凍結乾燥してF-II-1の粉末7.5mg(収率5.4%)、F-II-2の粉末20.5mg(収率14.5%)、F-II-3の粉末41.5mg(収率29.6%)およびF-II-4の粉末31.0mg(収率22.1%)を得た。

F-II-3の粉末を1N酢酸水3mlに溶かし、セファデックスG-50のカラム(2.8×94cm)にチャージし、1N酢酸水でゲル沪過した。溶出液を10mlづつ分画し、各フラクションを280nmで追跡し、39～49番目のフラクションを集めて凍結乾燥して粉末40mgを得た。

上記粉末を水5mlに溶かし、ジチオスレイトール5.3mgを加えて30℃で48時間還元した。反応液をセファデックスG-25のカラム(1.8×140cm)にチャージし、1N酢酸水で溶出した。

- 72 -

Met 1.25 (2)、Ile 1.23 (1)、Leu 5.20 (5)、Phe 1.00 (1)、Lys 2.87 (3)、His 2.38 (3)、Arg 2.00 (2)
^{1.89}
アミノ酸分析 [4M-MSA, 110℃, 48時間]; Asp 4.11 (4)、Ser 2.97 (3)、Glu 4.86 (5)、Gly 1.07 (1)、Val 3.16 (3)、Met 1.55 (2)、Ile 1.01 (1)、Leu 5.12 (5)、Phe 1.00 (1)、Trp 0.64 (1)、Lys 3.20 (3)、His 2.76 (3)、Arg 2.00 (2)

アミノ酸分析 [シグマ社製、ロイシンアミノペプチダーゼ Lot. No. L-6007, 38℃, 48時間], Asp 0.92 (1)、Asn 2.88 (3)、Ser 2.91 (3)、Glu 2.93 (3)、Gln 1.91 (2)、Gly 1.03 (1)、Val 3.11 (3)、Met 1.84 (2)、Ile 0.94 (1)、Leu 4.95 (5)、Phe 1.00 (1)、Trp 0.78 (1)、Lys 3.25 (3)、His 2.58 (3)、Arg 1.99 (2)

元素分析 [C₁₈H₂₉N₅S₂·9CH₃COOH·1.5

H₂Oとして]

C % H % N %

計算値 48.50 7.32 15.92

- 73 -

-427-

- 74 -

測定値 48.55 7.65 15.79

特開昭58- 96052(20)

高速液体クロマトグラフイー

カラム ; μ Bondapak C₁₈ (0.25" \times 1')

緩衝液 ; 0.1% 酢酸含有 0.1 M リン酸とアセ

トニトリルの 30 : 70 ~ 50 : 50 の

直線型濃度勾配

流速 ; 1 ml / 分

検出 ; 280 nm

結果 ; 7.6 分に 1 スポット検出

ディスク等電点電気泳動 (8 M 尿素ゲル, pH

3 ~ 10, 長さ 0.5 \times 6 cm, 1 mA, 200 V);

pH 10.0 より 0.75 cm の位置に 1 つのバンドのみを有する。

PTH 活性 ; ラット腎による PTH レセプター活性の結果は 5100 U/mg であつて、 h-PTH (1-34) (東洋醸造社製, 3300 U/mg) より

1.5 倍を活性を有する。
の

特許出願人
東洋醸造株式会社
代表者 伊東富士馬

- 75 -